

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 11 月 13 日 (13.11.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/093508 A1

- |   |  |  |
|---|--|--|
| (51) 国際特許分類:  | C12Q 1/68                                    | (IMAI, Kazushi) [JP/JP]; 〒162-0067 東京都 新宿区 富久町 1 2-1-2 9 0 2 Tokyo (JP).   |
| (21) 国際出願番号:  | PCT/JP03/05358                               |  |
| (22) 国際出願日:   | 2003 年 4 月 25 日 (25.04.2003)                 | (74) 代理人: 宮本 晴視 (MIYAMOTO, Harumi); 〒105-0001 東京都 港区 虎ノ門一丁目 1 9 番 1 4 号 邦楽ビル 7 階 Tokyo (JP).                                     |
| (25) 国際出願の言語:   | 日本語  |  |
| (26) 国際公開の言語:   | 日本語  | (81) 指定国 (国内): US.   |
| (30) 優先権データ:  | 特願2002-130883 2002 年 5 月 2 日 (02.05.2002) JP | (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR). |
| (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). |  | 添付公開書類:<br>— 国際調査報告書   |
| (72) 発明者: および   |  | 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。   |
| (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 今井 一志  |  |  |

(54) Title: METHOD OF DETECTING RHEUMATOID ARTHRITIS BY DETECTING OVEREXPRESSION OF WNT

(54) 発明の名称: WNT の発現の亢進を検出することにより慢性関節リウマチを検出する方法

(57) Abstract: A convenient and highly accurate pre-examination method of detecting rheumatoid arthritis wherein at least the overexpression of WNT or at least the overexpression of WNT10B and at least the regulated expression of FRP1 in joint oil, a joint tissue or peripheral blood are detected in parallel.

(57) 要約: 関節滑液、関節組織または末梢血液における少なくとも WNT の発現の亢進または少なくとも WNT10B の発現の亢進と少なくとも FRP1 の発現の抑制を並行的に検出することにより慢性関節リウマチを検出する、簡易で、精度が高い予診性の慢性関節リウマチの検出方法。

WO 03/093508 A1

## 明 細 書

WNTの発現の亢進を検出することにより慢性関節リウマチを検出する方法

## 技術分野

本発明は、関節滑液または末梢血液におけるWNT特にWNT10Bの発現の亢進を逆転写(RT)PCR法などにより検出することによる慢性関節リウマチ(RA:rheumatoid arthritis)の検出法に関する。更に、FRPの発現の抑制を並行的に検出することを特徴とする前記慢性関節リウマチ(RA:rheumatoid arthritis)の検出法に関する。

## 背景技術

RA診断にはアメリカリウマチ学会の定めた診断基準が本邦においても採用されている。該診断基準は、1) 1時間以上続く朝のこわばり、2) 3個所以上の関節の腫れ、3) 手の関節の腫れ、4) 対称性の関節の腫れ、5) 手のX線写真の異常、6) 皮下結節、7) 血液検査でリウマチ反応が陽性、である。この基準のうち4項目以上を満たし、更に1) - 4) に関しては6週間以上持続することを必要とする。この様に、診断基準は臨床所見に依存し診断時には既に病態が進行しているため、治療開始時期が遅れ治療効果が得難く、患者本人の精神的肉体的経済的負担が大きくなる。

また、RAの生化学的検査方法として、リウマトイド因子(rheumatoid factor)を検出する方法も利用されてい

るけれども、該検出方法では擬陽性および擬陰性の確立が高く信頼性に問題があった。

従って、より早期にRA特異性の高い客観的診断技術を確立することが社会的急務である (<http://www.rheuma-net.or.jp/>)。

一方、WNTファミリーはヒトでは16種類の遺伝子配列が明らかになっており、ヒトゲノム配列解読から更に3種類が存在すると考えられる。WNTは癌原遺伝子として発見された遺伝子であり、C-MycやサイクリンD1の発現を誘導することで細胞の過剰な増殖を招く。近年、RA関節滑膜においてWNT1、5A、10Bの発現が亢進し、滑膜細胞による炎症性サイトカイン〔インターロイキン-6、8、15 (IL-6、8、15)〕の産生を促進することが報告された (Sen, M., Lauterbach, K., El-Gabawy, H., Firestein, G. S., Corr, M. and Carson, D. A. Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 2791-2796, 2000.)。

因みに、変形性関節症 (OA) 関節滑膜ではWNT1、5Aおよび10Bは発現しない。

また、WNTは血管内皮細胞の増殖も促進することが知られている (Wright, M., Aikawa, M. Szto, W. and Papkoff, J. Identification of a WNT-responsive signal transduction pathway in primary endot

helial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 263:384-388, 1999.)。

更に、特開平11-113580公報、特に第4欄第1行～第3行には、Wnt-11活性またはレベルに関連した疾病のための診断アッセイに関する技術について言及し、【0033】～【0034】において前記診断アッセイについて説明している。

しかしながら、WNT、特にWNT10BのRA特異的発現を検出して、RA特異的診断が可能であることを説明する言及もない。更にRA関節滑膜においてWNT11の発現を認めることができず、本発明のRA特異的な診断方法にWNT11検出による診断アッセイは含まれていない。

本発明の課題は、関節滑液、関節組織あるいは末梢血中のWNTの発現の亢進を検出することにより、RAを予防的に早期に発見する、RA特異的な診断方法を提供することである。

先ず、発生学的にWNTは様々な臓器に発現し、胎生期の器官形態形成に極めて重要な役割を果たしていることが報告されている (Moon, R. A., Brown, J. D. and Torres, M. WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. Trends Genet. 13:157-162, 1997.)。しかし、器官形成完了後において発現は停止することから、成体の維持に積極的役割を持たないと考えられる。このことと前記WNT発現とを対比して考えると、WNT発現はRA関節滑膜異常を招く、あるいは、促進する原因である可能性が考えられる。

そこで、本発明者は関節破壊をきたす疾患であり関節滑膜の異常を伴うRAと異常を伴わないOAに発現するWNTとその特異的

## 4

阻害分子である *FRP* の発現プロファイルを明らかにした。その結果、*WNT10B* が *RA* 特異的に発現する分子であり、他の *WNT* の発現率は *RA*、*OA* とともに極めて低いことを確認した。また、*WNT10B* は *RA* 関節滑膜組織の滑膜表層細胞と血管内皮細胞に局在していることも分かった。

逆に *FRP* は *OA* 特異的に発現し、特に全ての *OA* 症例で発現していた *FRP1* は *WNT10B* と同様に滑膜表層細胞および血管内皮細胞に認められた。従って、*OA* においては *FRP* が発現することで *WNT* を介した関節滑膜の異常を防いでいる可能性が高い。*WNT* を標的分子とし、合成ペプチド、化学合成物質や精製 *FRP* タンパクを関節腔内あるいは血中に投与することで、*WNT* 生物活性を阻害することは生体偽害性や副作用の少ない生物学的治療法として有用である可能性も高い。

*RA* 特異的 *WNT*、特に *WNT10B* の発現が 4 / 5 の症例において確認されたことから、関節滑液あるいは末梢血中の *WNT*、特に *WNT10B* の存在を測定することで *RA* 特異的診断法を確立できることを確認し、前記本発明の課題を解決することができた。

#### 発明の開示

本発明は、(1) 関節滑液、関節組織または末梢血液における少なくとも *WNT10B* の発現の亢進を検出する慢性関節リウマチを検出する方法である。好ましくは、(2) 少なくとも *WNT10B* の発現の亢進を *RT-PCR* 法により検出する前記(1)の慢性関節リウマチを検出する方法であり、より好ましくは、(3) 少なくとも *FRP* の発現の抑制を並行的に

検出する前記（１）または（２）の慢性関節リウマチを検出する方法であり、一層好ましくは、（４）少なくとも *FRP1* の発現の抑制を並行的に検出する前記（３）の慢性関節リウマチを検出する方法である。

#### 図面の簡単な説明

第１図は、*RT-PCR*法による *WNT* 遺伝子発現の解析を示す。１－５の *RA* 関節滑膜組織の *WNT3*、*WNT5A*、*WNT10B* および *WNT14* 発現の解析、および６－９の *OA* 関節滑膜組織の *WNT3*、*WNT5A*、*WNT10B* および *WNT14* 発現の解析を示す。

第２図は、*RT-PCR*法による *FRP* 遺伝子発現の解析を示す。１－５の *RA* 関節滑膜組織の *FRP1*、*FRP2*、*FRP3*、*FRP4*、および *FRP5* 発現の解析、および６－９の *OA* 関節滑膜組織の *FRP1*、*FRP2*、*FRP3*、*FRP4*、および *FRP5* 発現の解析を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明をより詳細に説明する。

１、関節滑膜の異常を伴う *RA* と異常を伴わない *OA* に発現する *WNT* とその特異的阻害分子である *FRP* の発現プロファイルの作製。

（１）人口関節置換術により切除されたヒト *RA* の５例の１－５あるいは *OA* の４例の６－９の関節滑膜組織に発現する全 *RNA* を Chomczynski and Sacchi の方法に従い採取した。ゲノム *DNA* の混入を防ぐため、*RNAse-free DNase I* で

37℃30分間処理を行い、ゲノムDNAを分解した。

(2) 5  $\mu$ g 全RNAをオリゴd(T)プライマー(Gibco BRL, Giathusberg, Germany)および逆転写酵素(SuperScript II, Gibco BRL)を用いて1st strand cDNA (50  $\mu$ l)を合成した。その後、1  $\mu$ lのcDNAを鋳型として94℃5分間加熱後、表1に示す新規塩基配列のRT-PCRプライマーとTaq DNAポリメラーゼ(Gibco BRL)を用いてPCR反応を行った。一検体50  $\mu$ Lにて熱変性を94℃30秒、表1に示すアニーリング温度で30秒、伸長反応1分間行い、これを1サイクルとして計30サイクル繰り返した。反応終了後の試料を2%アガロースゲル電気泳動し、PCR増幅反応の有無を確認した。

表 1

プライマー	配 列	アニール 温度 °C
WNT1	(forward) 5'-TCCTGCTCAGAAGGTTCCAT (reverse) 5'-GCTGTACGTGCAGAAGTTGG	54
WNT2	(forward) 5'-CTGTATCAGGGACCGAGAGG (reverse) 5'-CAAAGAGAACTCGCCAGGAG	51
WNT2B	(forward) 5'-ACTGAGTGTGTGCAGCTGTG (reverse) 5'-TGATGTCTTGCTGCAGACAC	54
WNT3	(forward) 5'-ACTTCGGCGTGTTAGTCTCC (reverse) 5'-ATTTTTCCTTCCGCTTCTCC	54
WNT4	(forward) 5'-TTGAGGAGTGCCACTACCAG (reverse) 5'-TTGAACTGTGCGTTGCGTGG	54
WNT5A	(forward) 5'-CAGTTCAAGACCGTGCGAGAC (reverse) 5'-TGGAACCTACCCATCCCATA	58
WNT5B	(forward) 5'-GTGCTGCTTCGTCAGGTGTA (reverse) 5'-CGAGGTTGAAGCTGAGTTCC	54
WNT6	(forward) 5'-CAACTGCACAACAACGAGGC (reverse) 5'-GTACTACGCAGCACCAGTGG	54
WNT7A	(forward) 5'-GAGAAGCAAGGCCAGTACCA (reverse) 5'-ACAGCACATGAGGTCACAGC	54
WNT8A	(forward) 5'-ACATGCTATCAGCTCTGCTG (reverse) 5'-AAAGATCAGTTCCGCCTCTG	54
WNT8B	(forward) 5'-GAAAGTGGCAAGCTTTGGAG (reverse) 5'-GAAAGTGGCAAGCTTTGGAG	54
WNT10A	(forward) 5'-AATGAGGCTTCACAACAACC (reverse) 5'-TCATGTGGTCCAATCTCCTC	54
WNT10B	(forward) 5'-CTTCATTGATACCCACAACC (reverse) 5'-ATTGTTGGGGAGAAGGCTAC	58
WNT11	(forward) 5'-TGACCTCAAGACCCGATACC (reverse) 5'-CAAGTGAAGGCAAAGCACAA	54
WNT14	(forward) 5'-AAGATGGTGCCAACTTCACC (reverse) 5'-TAAGGAACCAGCCAGGACAC	58
WNT16	(forward) 5'-GTGACACCACCTTGCAGAAC (reverse) 5'-ACCCTCTGATGTACGGTTGC	54
FRP1	(forward) 5'-CTTGTTCTTGACGATTTCCC (reverse) 5'-AGAGAAGGCAATGCCTCTCC	54
FRP2	(forward) 5'-AAAGACAGCTTGCAGTGCAC (reverse) 5'-TGTTATGACAACCTCAGTGG	54
FRP3	(forward) 5'-CATTGACTTCCAGCACGAGC (reverse) 5'-ACGAAGCTTCATATCCCAGC	56
FRP4	(forward) 5'-AGAGGAGTGGCTGCAATGAG (reverse) 5'-TGGCCTTACATAGGCTGTCC	58
FRP5	(forward) 5'-AAGTGGATGGACAGCTGCTG (reverse) 5'-TACTTTCTGAGACCCTGAGG	54
GAPDH	(forward) 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT (reverse) 5'-AGGGGAGCTTCAGTGTGGTG	52



*WNT10B* は極めて高率（4 / 5 例）に前記 5 例の 1 - 5 の切除 *RA* 組織に発現していたが、前記 *OA* の 4 例の 6 - 9 では 1 / 4 例に陽性であった。他の *WNT* に関してはいずれも発現率が低いが発現していなかった。前記 *WNT* の *RT-PCR* 法による解析結果は第 1 図に示されている。*FRP1* は前記 *OA* の 4 例の全てに発現し、*FRP2* と *FRP4* は 2 / 4 例に、*FRP3* と *FRP5* は 1 / 4 例にみられた。前記 *RA* の 5 例ではいずれの *FRP* 遺伝子ともに 1 / 5 例に陽性あるいは発現していなかった。前記 *FRP* の *RT-PCR* 法による解析結果は第 2 図に示されている。前記およびの前記第 1 図および第 2 図の *RT-PCR* 法による解析結果、すなわち遺伝子増幅のあり（+）、なし（-）をまとめたものを表 2 に示す。表中において *ND* は未検討であることを意味する。

表 2

	RA					OA			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
WNT1	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
WNT2	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
WNT2B	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
WNT3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WNT4	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
WNT5A	-	-	+	-	-	-	-	-	-
WNT5B	-	-	-	+	-	-	ND	+	-
WNT6	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
WNT7A	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
WNT8A	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
WNT8B	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
WNT10A	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
WNT10B	+	+	+	+	-	-	-	+	-
WNT11	-	-	-	-	-	-	ND	+	-
WNT14	-	-	-	+	-	-	-	+	-
FRP1	-	-	-	+	-	+	+	+	+
FRP2	-	-	-	+	-	-	-	+	+
FRP3	-	-	-	-	-	-	-	+	-
FRP4	-	-	-	+	-	-	-	+	+
FRP5	-	-	-	-	-	-	-	+	-

ホルマリンあるいはパラホルムアルデヒド固定したヒト R A ある

## 10

いはOA関節滑膜組織のパラフィン包埋切片を脱パラフィン後、エタノール系列で親水処理、0.01M(モル)クエン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)中で電子レンジ加熱処理(500W、4分間3回)を行った。次に、組織切片を正常ヤギ血清、正常ロバ血清、正常ウサギ血清あるいは1%ウシ血清アルブミンで30分間室温処理し、ヤギ抗Wnt10b抗体(1 $\mu$ g/ml, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 米国)、ヤギ抗FRP1抗体(2 $\mu$ g/ml, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 米国)あるいはウサギ抗 von Willbrand Factor(vWF)抗体(200倍希釈、DAKO、Carpinteria, CA, 米国)と反応した。その後、Alexa Fluor 546抗ウサギ抗体、Alexa Fluor 546抗ヤギ抗体(Molecular Probes, Eugene, OR, 米国)あるいはFITC標識抗ヤギ抗体(Vector, Burlingame, CA, 米国)と90分間室温でインキュベートし、蛍光顕微鏡を用いて各抗原の組織内局在を同定した。

RA関節滑膜においてWNT10Bは滑膜表層細胞および血管内皮細胞に局在していた。OA関節滑膜においては反応はみられなかった。逆にFRP1はOAにおいて滑膜表層細胞と血管内皮細胞に局在していたが、RA組織では陰性であった。

WNT10BおよびFRP1の血管内皮細胞への局在は、血管内皮細胞に特異的に反応する抗vWF抗体との二重染色法で確認された。

該染色法により得られた免疫組織染色写真像から、RA関節滑膜におけるWNT10B陽性細胞、すなわちRA組織の局在発現、およびOA関節滑膜におけるFRP1陽性細胞、すなわちOA組織の局在発現を観察することができた。

### 産業上の利用可能性

本発明により、関節破壊をきたす疾患であり関節滑膜の異常を伴う R A と異常を伴わない O A に発現する *WNT* とその特異的阻害分子である *FRP* の発現プロファイルを明らかにした。すなわち、逆転写 (R T) - P C R プライマーを用いた R T - P C R 法、特に、*WNT10B* または *WNT10B* および *FRP1* の並列的 R T - P C R 法による前記遺伝子発現における遺伝子増幅の陰陽により、疑似発現などのない早期の R A 特異的診断法を確立した。これにより、簡易で確実な R A 特異的診断法を確立することができ、極めて産業上の利用性の高い技術を提供するものである。

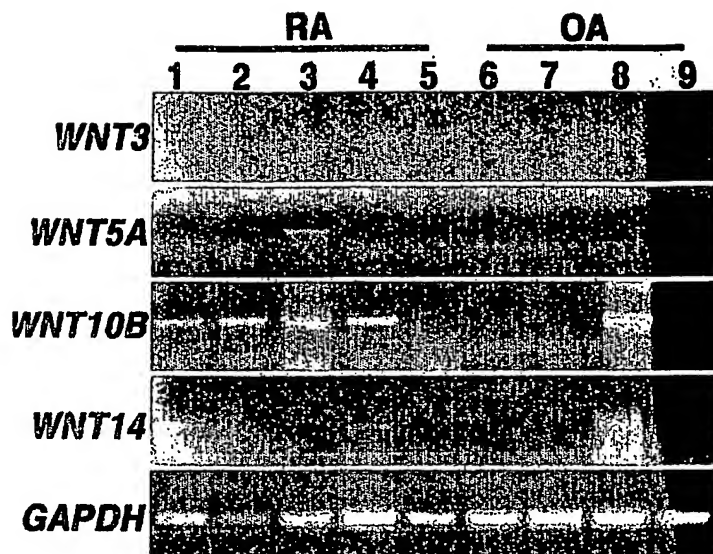
## 1 2

## 請 求 の 範 囲

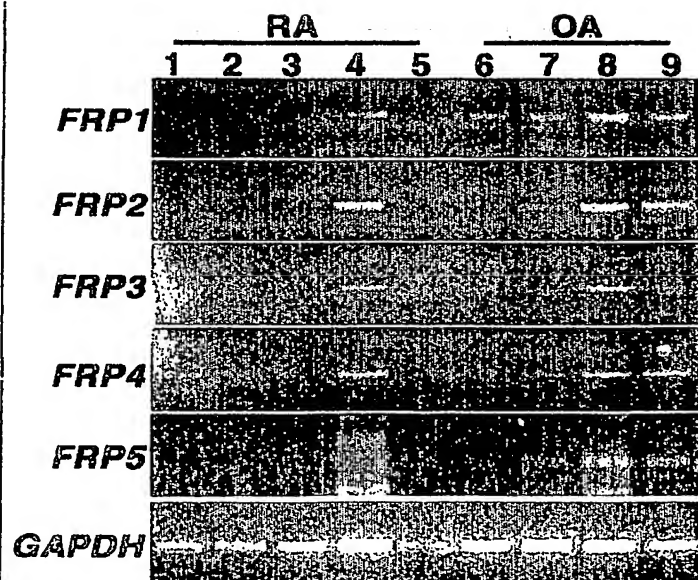
1. 関節滑液、関節組織または末梢血液における少なくとも *WNT10B* の発現の亢進を検出する慢性関節リウマチを検出する方法。
2. 少なくとも *WNT10B* の発現の亢進を *RT-PCR* 法により検出する請求の範囲 1 の慢性関節リウマチを検出する方法。
3. 少なくとも *FRP1* の発現の抑制を並行的に検出する請求の範囲 1 の慢性関節リウマチを検出する方法。
4. 少なくとも *FRP1* の発現の抑制を並行的に検出する請求の範囲 2 の慢性関節リウマチを検出する方法。

1 / 1

第 1 図



第 2 図



1 / 1 1

## 【配列表】

&lt;110&gt; Japan Science and Technology Corporation

&lt;120&gt; W N Tの発現の亢進を検出することにより慢性関節リウマチを検出する方法

&lt;160&gt;44

&lt;210&gt;1

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;1

5'-tcctgctcag aaggttccat

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;2

5'-gctgtacgtg cagaagttgg

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;3

5'-ctgtatcagg gaccgagagg

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt; 20

2 / 1 1

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;4

5'-caaagagaac tcgccaggag

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;5

5'-actgagtgtg tgcagctgtg

&lt;210&gt;6

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;6

5'-tgatgtcttg ctgcagacac

&lt;210&gt;7

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;7

5'-acttcggcgt gttagtctcc

&lt;210&gt;8

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A



3 / 1 1

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;8

5'-attttttcctt ccgcttctcc

&lt;210&gt;9

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;9

5'-ttgaggagtg ccactaccag

&lt;210&gt;10

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;10

5'-ttgaactgtg cgttgcgtgg

&lt;210&gt;11

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;11

5'-cagttcaaga ccgtgcagac

&lt;210&gt;12

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

4 / 1 1

&lt;400&gt;12

5'-tggaacctac ccatcccata

&lt;210&gt;13

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;13

5'-gtgctgcttc gtcagggtgta

&lt;210&gt;14

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;14

5'-cgagggttgaa gctgagttcc

&lt;210&gt;15

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;15

5'-caactgcaca acaacgaggc

&lt;210&gt;16

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;16

5 / 1 1

5'-gtactacgca gcaccagtgg

&lt;210&gt;17

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;17

5'-gagaagcaag gccagtacca

&lt;210&gt;18

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;18

5'-acagcacatg aggtcacagc

&lt;210&gt;19

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;19

5'-acatgctatc agctctgctg

&lt;210&gt;20

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;20

5'-aaagatcagt tccgcctctg

6 / 1 1

&lt;210&gt;21

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;21

5'-gaaagtggca agctttggag

&lt;210&gt;22

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;22

5'-gaaagtggca agctttggag

&lt;210&gt;23

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;23

5'-aatgaggcttcacaacaacc

&lt;210&gt;24

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;24

5'-tcatgtggtc caatctcctc

&lt;210&gt;25

7 / 1 1

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;25

5'-cttcattgat acccacaacc

&lt;210&gt;26

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;26

5'-attggttgggg agaaggctac

&lt;210&gt;27

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;27

5'-tgacctcaag acccgatacc

&lt;210&gt;28

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;28

5'-caagtgaagg caaagcaciaa

&lt;210&gt;29

&lt;211&gt; 20

8 / 1 1

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;29

5'-aagatggtgc caacttcacc

&lt;210&gt;30

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;30

5'-taaggaacca gccaggacac

&lt;210&gt;31

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;31

5'-gtgacaccac cttgcagaac

&lt;210&gt;32

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;32

5'-accctctgat gtacggttgc

&lt;210&gt;33

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

9 / 1 1

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;33

5'-cttggttcttg cagcattccc

&lt;210&gt;34

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;34

5'-agagaaggca atgcctctcc

&lt;210&gt;35

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;35

5'-aaagacagct tgcagtgcac

&lt;210&gt;36

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;36

5'-tgttatgaca acctcagtgg

&lt;210&gt;37

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

1 0 / 1 1

&lt;400&gt;37

5'-cattgacttc cagcagcagc

&lt;210&gt;38

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;38

5'-acgaagcttc atatcccagc

&lt;210&gt;39

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;39

5'-agaggagtggctgcaatgag

&lt;210&gt;40

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;40

5'-tggccttacataggctgtcc

&lt;210&gt;41

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt;D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;41



1 1 / 1 1

5'-aagtggatgg acagctgctg

&lt;210&gt;42

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;42

5'-tacttttctga gaccctgagg

&lt;210&gt;43

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;43

5'-gtcagtggtg gacctgacct

&lt;210&gt;44

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; D N A

&lt;213&gt; Artifificial

&lt;400&gt;44

5'-aggggagctt cagtgtggtg

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/05358

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	Malini SEN et al., Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, March 2000, Vol.97, No.6, pages 2791 to 2796	<u>1,2</u> 3,4
<u>Y</u> A	Hovsep S.MELKONYAN et al., SARPs: A family of secreted apoptosis-related proteins. Proc.Natl. Acad.Sci.USA, December 1997, Vol.94, pages 13636 to 13641	<u>3,4</u> 1,2
P,A	Kosei IJIRI et al., Differential Expression Patterns of Secreted Frizzled Related Protein Genes in Synovial Cells from Patients with Arthritis. The Journal of Rheumatology. November 2002, Vol.29, No.11, pages 2266 to 2270	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
25 June, 2003 (25.06.03)Date of mailing of the international search report  
08 July, 2003 (08.07.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>1</sup> C 1 2 Q 1 / 6 8

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>1</sup> C 1 2 Q 1 / 6 8

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に利用した用語)  
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	Malini SEN et al. Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, March 2000, Vol. 97, No. 6, p. 2791-2796	<u>1, 2</u> 3, 4
<u>Y</u> A	Hovsep S. MELKONYAN et al. SARPs: A family of secreted apoptosis-related proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. December 1997, Vol. 94, p. 13636-13641	<u>3, 4</u> 1, 2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 06. 03

国際調査報告の発送日

08.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子



4-B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	Kosei IJIRI et al. Differential Expression Patterns of Secreted Frizzled Related Protein Genes in Synovial Cells from Patients with Arthritis. The Journal of Rheumatology. November 2002, Vol. 29, No. 11, p. 2266-2270	1 - 4